

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 07-115966

(43)Date of publication of application : 09.05.1995

(51)Int.Cl.

C12N 5/06

C12N 7/00

(21)Application number : 06-204064

(71)Applicant : HITACHI CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 30.08.1994

(72)Inventor : TAKADA KENZO  
TOCHIKURA AKIKO  
YAMAKI MITSUO

(30)Priority

Priority number : 05214641

Priority date : 31.08.1993

Priority country : JP

**(54) CELL STRAIN HAVING ABILITY TO SEPARATE AND PROLIFERATE EB VIRUS AND METHOD FOR SEPARATING AND PROLIFERATING EB VIRUS USING THE SAME**

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To separate and proliferate a large amount of Epstein-Barr (EB) virus in various materials and apply the EB virus to a vaccine or a vector for genetic therapy by inoculating a cell strain uninfected with the EB virus in which the EB virus is deciduous from an Akata cell into a pharyngeal wiped liquid, etc.

**CONSTITUTION:** This method for proliferating EB virus is to carry out treatment such as subculture for a long period, treatment with a variation inducing chemical substance, temperature change or UV irradiation alone or in combination of an Akata cell, providing a cell strain uninfected with the EB virus in which the EB virus is deciduous, infect the cell strain with the EB virus in a pharyngeal wiped liquid, blood, a humor, an extract solution of a tissue or a cell, a culture supernatant, etc., and then perform the treatment with an anti-human immunoglobulin antibody.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 07.06.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 11.01.2005

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2005-02270

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 10.02.2005

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-115966

(43)公開日 平成7年(1995)5月9日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/06 7/00		9281-4B 8412-4B	C 1 2 N 5/ 00	E

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 3 頁)

(21)出願番号	特願平6-204064	(71)出願人	000004455 日立化成工業株式会社 東京都新宿区西新宿2丁目1番1号
(22)出願日	平成6年(1994)8月30日	(72)発明者	高田 寛蔵 山口県宇部市北琴芝一丁目2番11号
(31)優先権主張番号	特願平5-214641	(72)発明者	橋倉 明子 京都府長岡京市下海印寺東条1
(32)優先日	平5(1993)8月31日	(72)発明者	山木 光男 茨城県日立市東町四丁目13番1号 日立化 成工業株式会社医薬品研究所内
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(74)代理人	弁理士 若林 邦彦

(54)【発明の名称】 EBウィルス分離増殖能を有する細胞株及びこれを用いたEBウィルスの分離増殖法

(57)【要約】

【構成】 EBウィルス分離増殖能を有し、かつ次の性質(1)ヒトリンパ球癌細胞(Ak a t a細胞)由来である、(2)EBウィルス非感染である、を有する細胞株及びこの細胞株にEBウィルスを感染させ、抗ヒトイムノグロブリン抗体処理することによるEBウィルスの分離増殖法。

【効果】 EBウィルスを大量に分離増殖でき、各所に存在する野生ウィルスの分離増殖および相同組換え等により作製したウィルスの分離増殖にも使用できる。新規に分離増殖されたウィルスはワクチン、遺伝子治療のベクターなどに利用できる。さらに、本細胞株に各種マーカーを導入し、効率的にウィルスの分離増殖を行うこともできる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 EBウイルス分離増殖能を有し、かつ次の性質(1)ヒトリンパ球癌細胞(Akatta細胞)由来である、(2)EBウイルス非感染である、を有する細胞株。

【請求項2】 EBウイルスに感染させた後に抗ヒトイムノグロブリン抗体処理することによりEBウイルスを分離増殖する請求項1記載の細胞株。

【請求項3】 寄託番号がFERM BP-4742である請求項1記載の細胞株。

【請求項4】 請求項1、2又は3記載の細胞株にEBウイルスを感染させ、該感染細胞を抗ヒトイムノグロブリンで刺激してEBウイルスを増殖することを特徴とするEBウイルスの分離増殖法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、従来分離増殖が困難であったエプスタインバー(Epstein-Barr)ウイルス(以下、EBウイルスと略す)を効率的に分離増殖させることができ、EBウイルスのウイルス診断等に利用できる細胞株及びこれを用いたEBウイルスの分離増殖法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】EBウイルスは、脾帯血リンパ球あるいは末梢血リンパ球に感染し、細胞をトランスフォームさせる。しかし、一般的にEBウイルスは、細胞に持続的に潜伏感染するのみで、感染した細胞は成熟したウイルスをほとんど産生しない。また、EBウイルス未感染Bリンパ球細胞株(BJAR、Ramos等)にEBウイルスを持続感染させることは可能であるが、大量のEBウイルスを産生させることはできない(Fields, B.N. and D.M. Knipe(ed.).1990. Virology, 2nd ed. Raven press, New York: Chapter 68, Epstein-Barr Virus. Biology, pathogenesis, and medical aspects.G. Miller, p1921-1957.)。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】EBウイルス産生細胞としては、Akatta細胞、B95-8細胞、P3HR1細胞などが知られている。特にAkatta細胞は、抗ヒトイムノグロブリン抗体処理によりEBウイルスを大量に産生する(Takada K, Int. J. Cancer, 33,27-32(1984) および Takada, K. and Ono Y, J. Virol. 63, 445-449(1989).)。しかし、これらの細胞は既にEBウイルスに感染したものであってその既感染のEBウイルスを産生するにすぎず、これらの細胞を使用して細胞外のEBウイルスを効率的に分離増殖したとの報告はない。また、EBウイルス陰性のB-リンパ腫細胞であるBJAB、BL30、BL41及びLoukesを用いてEBウイルスの分離増殖を検討したことが報告されている(A.Marchini,R.Longnecker and E.Kieff, J. Virol. 60

6, 4972-4981(Aug.1992))。しかしながら、これらの細胞は、EBウイルスを産生させるために5-AZACYTIDIN E、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)等の化学物質や特殊なプラスミド(pSVNaeZ)で誘発させる必要があるため、化学物質による人体への影響(安全性)の面で問題があったり、プラスミドの誘発は効率が悪い等の問題があり、またそれらの分離増殖量はEBウイルスの分離増殖用細胞株として満足のいくものではない。【0004】

10 【課題を解決するための手段】我々は、様々な試料中のEBウイルスを効率的かつ安全に大量分離増殖させる手段を鋭意検討してきた。その結果、抗ヒトイムノグロブリン抗体処理によりEBウイルスを大量に産生するEBウイルス既感染細胞であるAkatta細胞を、インビトロで長期継代培養することによりEBウイルスが脱落したEBウイルス非感染細胞株を分離した。そしてこの細胞株が咽頭ぬぐい液中のEBウイルスを効率的に大量に分離増殖させることを見出し、本発明を完成させるに至った。

20 【0005】即ち本発明は、EBウイルス分離増殖能を有し、かつ次の性質(1)ヒトリンパ球癌細胞(Akatta細胞)由来である、(2)EBウイルス非感染である、を有する細胞株、及びこの細胞株にEBウイルスを感染させ、該感染細胞を抗ヒトイムノグロブリンで刺激してEBウイルスを増殖することを特徴とするEBウイルスの分離増殖法に関する。本発明の細胞株の親細胞としては、既知のヒトリンパ球癌細胞であるAkatta細胞を用いる。Akatta細胞からEBウイルスの脱落した細胞を得るには、長期継代、変異誘発性化学物質(MNNG等)、温度変化、UV照射、放射線照射、サイクロヘキシミド処理、BZLF1遺伝子導入等の単独あるいは組合せの処理により実施できるが、後述する実施例においては、長期継代を使用している。

30 【0006】Akatta細胞は、各種濃度のウシ胎児血清を含む培養液中で培養できるが、10%ウシ胎児血清を含む培養液が推奨される。また、血清を含まないような無血清培地中でも培養できる。各種アミノ酸、糖類等を含むような培養液においても培養できる。3日~4日おきに $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 個/mlの細胞密度で新しい培養液に分散し、33℃~40℃の温度で培養できる。培養温度は、37℃が推奨される。

40 【0007】前記の処理後、例えば培養条件で長期継代を行なった後に得られる、EBウイルスの脱落した細胞の一次スクリーニング法としては、抗ヒトイムノグロブリン処理による反応性を指標とする方法、EBウイルス核内抗原を検出する蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、PCR(Polymerase Chain Reaction)法等が適宜使用できる。後述する実施例においては抗ヒトイムノグロブリン処理による反応性を指標とする方法を用いている。

【0008】上記の方法により得られる本発明の細胞株は細胞外のEBウィルスの分離増殖能を有する。本発明の細胞株を用いたEBウィルスの分離増殖は、材料として咽頭ぬぐい液、血液、体液、組織・細胞抽出液、培養上清等が使用できる。後述する実施例においては咽頭ぬぐい液を使用している。

【0009】本発明の細胞株の好適例であるEBウィルス分離増殖能を有する細胞株クローン6を、1993年6月3日に工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託番号FERM BP-4742（当初の国内寄託番号FERM P-13675を国際寄託に変更）として寄託した。この細胞株はヒトリンパ球癌細胞（Akata細胞）由来変異株であり、EBウィルスが脱落したものであり、染色体は2倍体の細胞である。形態は球状の浮遊形である。また、この細胞株の培養は、各種濃度のウシ胎児血清を含む培養液中などで培養できるが、10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地などが推奨される。継代は3～4日おきに $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 個/mlの細胞密度で新しい培養液に分散し、33℃～40℃の温度で培養できるが、37℃が推奨される。この細胞株は液体窒素中で長期保存が可能である。

【0010】本発明の細胞株を用いたEBウィルスの分離増殖は、まず、EBウィルスを有する上記材料等で本発明の細胞株にEBウィルスを感染させ、次いで、抗ヒトイムノグロブリン抗体処理を行ない、EBウィルスを大量に産生させることにより行うことができる。このようにして得られるEBウィルスは各種用途に使用できる。またこの性質を利用してEBウィルスのウィルス診断にも使用できる。さらに得られるEBウィルスは遺伝子治療のベクターとして使用できる。

#### 【0011】

##### 【実施例】

##### 実施例1

Akata細胞の長期培養によるEBウィルス脱落細胞クローンの分離は次のようにして実施した。週2～3回の頻度で継代培養を5年間繰返し、蛍光抗体染色によりEBウィルス陰性の割合が約60%であるEBウィルス陰性細胞集団を作製した。次に、EBウィルス陰性細胞集団をコンデションド培養液（Akata細胞の培養上清）50%と20%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培養液50%よりなる培養液に懸濁し、ウェルあたり0.5個の細胞が含まれるように96穴プレートに播種した（ウェルあたり細胞懸濁液200μlを96穴プレート4枚に播種した）。播種後、5%炭酸ガス、37℃、飽和湿度下培養を行った。培養液は、3日～4日毎に半量を新しいものと交換した。3週間後、約50%の

ウェル中に細胞増殖が認められた。この内、単一コロニーとして細胞増殖が認められた56ウェル中のクローンについてEBウィルス抗原（EBNA）について蛍光抗体法により評価を行ったところ28クローンがEBウィルス（EBNA）陰性であった。そこで、この内の5クローン（クローン番号5、6、9、13、14）についてウエスタンブロット法によりEBウィルス抗原陰性であること、サザンブロッティング法、PCR法によりEBウィルスDNA陰性であることを確認した。

##### 【0012】実施例2

標準ウィルス株としてB95-8細胞培養上清中のEBウィルスを実施例1で分離増殖したクローン6に接種し、5%炭酸ガス、37℃、飽和湿度下で培養した。培養2日後、蛍光抗体染色法によりEBウィルス抗原（EBNA）について調べたところ、約30%の細胞がEBNA陽性であることを確認した。次に抗ヒトイムノグロブリン抗体（カッベル社製）を加え、さらに2日間培養を行った。この細胞について蛍光抗体法によりウィルス産生のマーカーであるVCA（ウィルスカプシド抗原）の検出を行った。その結果、約13%の細胞がVCA陽性であり、本細胞がEBウィルスの分離増殖に適した細胞であることが確認された。

##### 【0013】実施例3

咽頭ぬぐい液を実施例1で分離したクローン6に接種し、約2ヶ月間培養した。蛍光抗体染色法によりEBウィルス抗原（EBNA）について調べたところ、約30%の細胞がEBNA陽性であった。次いで抗ヒトイムノグロブリン抗体（カッベル社製）処理により咽頭ぬぐい液由来のEBウィルスの産生を行った。抗ヒトイムノグロブリン処理2日後、約21%の細胞がVCA陽性でありウィルス産生を行っていた。ウィルス産生量は、培養液1リットルあたりウィルスDNAとして20μgであり、B95-8細胞の約2倍の水準であった。このことにより、Akata細胞より分離増殖したEBウィルス陰性細胞株を使用して、咽頭ぬぐい液中のEBウィルスを大量に分離増殖できることが明らかとなった。

##### 【0014】

【発明の効果】本発明の細胞株は、各種材料中のEBウィルスを大量に分離増殖できる。従って、各所に存在する野生ウィルスの分離増殖および相同組換え等により作製したウィルスの分離増殖に使用できる。新規に分離増殖されたウィルスは、ワクチンなどに利用できる。さらに、本細胞株に各種マーカーを導入し、効率的にウィルスの分離増殖を行うこともできる。また、得られるEBウィルスは遺伝子治療のベクターとして使用できる。